

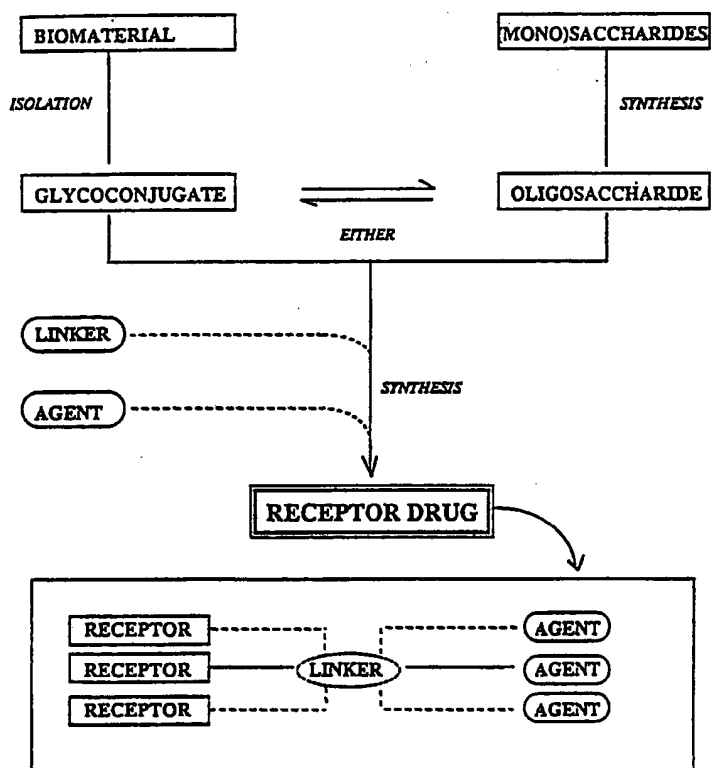


## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|  |           |  |
|--|-----------|--|
| <b>(51) International Patent Classification 5 :</b><br><br><b>A61K 47/48, 9/127</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 93/02709</b><br><br><b>(43) International Publication Date:</b> 18 February 1993 (18.02.93)                                  |
| <b>(21) International Application Number:</b> PCT/US91/05422<br><br><b>(22) International Filing Date:</b> 31 July 1991 (31.07.91)<br><br><b>(71) Applicant:</b> MICROCARB INC. [US/US]; Parkview Building, Suite 100, 300 Professional Drive, Gaithersburg, MD 20879 (US).<br><br><b>(72) Inventors:</b> KRIVAN, Howard, C. ; 7703 Ironforge Ct., Derwood, MD 20855 (US). BLOMBERG, Arne, Lennart, Ingemar ; Villa Vallmo, Linnegatan 7, S-223 60 Lund (SE).<br><br><b>(74) Agents:</b> SHARKEY, Richard, G. et al.; Seed and Berry, 6300 Columbia Center, Seattle, WA 98104-7092 (US). |           | <b>(81) Designated States:</b> CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE).<br><br><b>Published</b><br><i>With international search report.</i> |

**(54) Title:** RECEPTOR CONJUGATES FOR TARGETING DRUGS AND OTHER AGENTS**FLOWCHART RECEPTOR DRUG SYNTHESIS****(57) Abstract**

A variety of conjugates, comprising at least one agent coupled to at least one receptor which binds a microorganism, are provided. Preferred agents include anti-infectives, such as antibiotics and synthetic drugs. Uses of the conjugates include as *in vitro* inhibitors and as therapeutic agents, e.g., for the treatment of infections due to pathogenic microorganisms.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-511466

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)12月22日

|               |      |         |     |
|---------------|------|---------|-----|
| (51) Int.Cl.* | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I |
| A 6 1 K 47/48 | Z    | 7433-4C |     |
| 9/127         | L    | 9455-4C |     |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 12 頁)

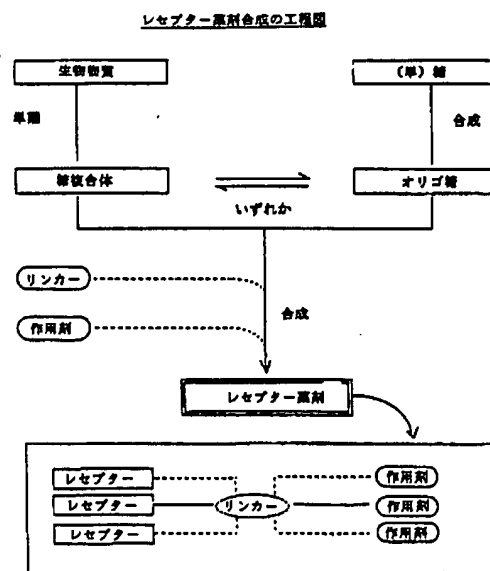
(21) 出願番号 特願平3-514489  
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)7月31日  
(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)1月31日  
(86) 国際出願番号 PCT/US91/05422  
(87) 国際公開番号 WO93/02709  
(87) 国際公開日 平成5年(1993)2月18日  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), CA, J P

(71) 出願人 マイクロカーブ インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 20879 メリーランド州  
ゲイサースパーク, プロフェッショナル  
ドライブ 300 スイート 100, パーク  
ビュー ビルディング  
(72) 発明者 クリヴァン, ハワード シー,  
アメリカ合衆国 20855 メリーランド州  
デルウッド, アイロンフォージ シーテ  
ィー. 7703  
(72) 発明者 プロムパーク, アルネ レナート インゲ  
マー  
スウェーデン国 ルンド エス-223 60  
リーネガタン 7, ヴィラ ヴァルモ  
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 薬剤および他の作用剤を標的へ向かわせるレセプター複合体

(57) 【要約】

微生物と結合する少なくとも1つのレセプターに結合された少なくとも1つの作用剤から成る、多様な複合体を提供する。好ましい作用剤には抗生物質や合成薬剤のような抗感染剤が含まれる。複合体はin vitro抑制剤として、または、例えば病原微生物により感染症を治療するための、治療剤として用いられる。



請求の範囲

1. 微生物と選択的に結合することが可能な少なくとも1つの微生物レセプターに結合された少なくとも1つの作用剤から成る、微生物レセプター複合体。
2. 前記の微生物が細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌および寄生虫より成る群から選ばれる、請求項1記載の複合体。
3. 前記の作用剤が微生物に対して細胞毒性である、請求項1記載の複合体。
4. 前記の作用剤が抗感染剤である、請求項1記載の複合体。
5. 前記の抗感染剤が抗生物質、合成薬剤およびステロイドより成る群から選ばれる、請求項1記載の複合体。
6. 前記の作用剤が前記微生物の中和を誘導する分子である、請求項1記載の複合体。
7. 前記の作用剤が抗体産生を刺激する分子である、請求項1記載の複合体。
8. 前記の複合体が、微生物と選択的に結合することが可能な少なくとも1つの微生物レセプターに結合された、少なくとも1つの作用剤を保持する担体から成る、請求項1記載の複合体。
9. 前記の担体がリポソームである、請求項8記載の複合体。
10. 治療剤として使用するための、請求項1〜9のいずれか1つに記載の複合体。
11. 病原微生物による感染症の治療法において使用するための、請求項1〜9のいずれか1つに記載の複合体。
12. 生物学的調製物を効果的な量の微生物レセプター複合体と接触

させることから成り、該複合体が微生物と選択的に結合することが可能な少なくとも1つの微生物レセプターに結合された少なくとも1つの作用剤から成ることを特徴とする、生物学的調製物中の微生物の抑制方法。

13. 前記の微生物が細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌および寄生虫より成る群から選ばれる、請求項12記載の方法。
14. 前記の複合体が、微生物と選択的に結合することが可能な少なくとも1つの微生物レセプターに結合された、少なくとも1つの作用剤を保持する担体から成る、請求項12記載の方法。
15. 前記の担体がリポソームである、請求項14記載の方法。

明細書

薬剤および他の作用剤を標的へ向かわせるレセプター複合体

発明の分野

本発明は、一般に、微生物と結合するレセプターに結合された、抗感染剤のような作用剤から成る複合体、およびこれらの複合体の製造法と使用方法に関する。

発明の背景

疾病の治療に使用する作用剤の特異性の欠如のために繰り返して生じる医薬品の問題点は、患者がしばしば、治療による一連の新しい病弊の受容者となることである。この状況は一般的であり、そして病原微生物による感染症の治療において生じている。

薬剤のような抗微生物剤の、患者に対する副作用を最小にしようとする従来の方法は、一部を付加したりおよび/または削除した無数の化学誘導体を製造することである。次いで、誘導体をその有効性と毒性について評価する。副作用を最小にするこのような方法はコストがかかり、時間を費し、常に成功するわけではない。

最小の副作用を示す抗微生物剤を製造する現在の方法での困難さ故に、当分野ではこのような作用剤に対する必要性が存在する。本発明はこの必要性を満たし、そしてさらに他の関連する利点も提供する。

発明の要約

手短かに述べると、本発明は、*in vitro*抑制剤として、および例

えば、病原微生物による感染症の治療のための治療剤として有用な種々の複合体を提供する。微生物レセプター複合体は、選択的に微生物に結合できるレセプターである、微生物レセプターの少なくとも1つと結合している少なくとも1つの作用剤を含む。好ましい微生物は、バクテリア、ウイルス、マイコプラズマ、真菌類および寄生虫を含む。

1つの実施態様では、複合体は、抗感染剤である作用剤を含む。好ましい抗感染剤は、抗生物質、合成薬剤およびステロイドを含む。もう1つの実施態様では、例えば、抗体の産生を刺激することにより、微生物の中和を誘導する分子である作用剤を含む。

関連する態様では、本発明は生物学的調製物における微生物の抑制方法を提供する。1つの実施態様では、この方法は、生物学的調製物を有効量の微生物レセプター複合体に接触させることから成り、ここで複合体は、選択的に微生物に結合できるレセプターである微生物レセプターの少なくとも1つと結合している少なくとも1つの作用剤を含む。

別の関連する態様では、本発明は病原微生物による感染症の治療法を提供する。1つの実施態様では、この方法は、温血動物に有効量の上記の複合体を投与することから成り、ここで微生物レセプターは選択的に病原微生物と結合できる。好ましい温血動物はヒトである。

これらのおよび他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面の参照により明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、作用剤部分が薬剤である、本発明の微生物複合体の製

造手順を説明する工程図を示す。

図2は、光反応性リンカーを使用する、アモキシシリンの糖脂質レセプターアシアロ-GM<sub>1</sub>への架橋を説明する図を示す。

#### 発明の詳細な説明

上述のように、本発明は、微生物レセプター複合体、並びにin vitroでの複合体の使用および例えば病原微生物による感染症の治療のための治療剤としての複合体の使用法を提供する。少なくとも1つの作用剤が少なくとも1つの微生物のレセプターと結合しているこれらの複合体は、効力の強い抗微生物組成物として多大な可能性を有している。これは、レセプター部分により複合体に付与された選択性による。レセプターの選択性により、病原体への指向性と特異性が増加する。さらに、本発明の複合体の使用による抗微生物剤の標的指向性により、用量と副作用、例えば患者の重要器官への毒性薬剤の蓄積が最小に抑えられる。

宿主細胞の糖タンパク質、タンパク質および糖脂質は、宿主細胞への微生物の認識および付着のレセプターとして機能できる。糖タンパク質または糖脂質レセプターの活性部分すなわち最小結合エпитープは、一般的に炭水化物部分のようである。これとは別に、糖タンパク質またはタンパク質上のエпитープは、そのアミノ酸残基から形成される。それ故、本発明の複合体の標的指向性部分（“微生物レセプター”）は、糖脂質またはその炭水化物部分；糖タンパク質、糖ペプチドまたはそのいずれかの炭水化物部分；またはタンパク質またはペプチドを含むことができる。本発明の微生物レセプターは精製したレセプターまたはその一部分、

合成的に製造したレセプターまたはその一部分、およびレセプターの誘導体またはその一部分を含む。微生物レセプターは選択的に微生物に結合できる。宿主細胞への微生物の認識と付着は、レセプターを選択的に微生物に結合させる、微生物上の分子と宿主細胞上の微生物レセプターとの、特異的相互作用により生じるものである。代表的な微生物は、バクテリア、ウイルス、マイコプラズマ、真菌類および寄生虫を含む。細胞に感染するためには、2以上の病原微生物が例えば炭水化物配列のような同一のエピトープに結合できる。反対に、微生物は特有のレセプター特異性を持つことができる。いずれの場合にも、微生物は、微生物レセプターへの選択的な結合により、宿主細胞に感染している。多くの微生物の糖脂質レセプターへの結合は、一般に約0.02-0.2マイクログラムの精製したレセプターの範囲内で半最大値(B<sub>1/2</sub>)となる。例えば、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)については約0.05 μgの固定化アシアロ-GM<sub>1</sub>により半最大値結合となり、そしてヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)は約0.1 μgの固定化レセプターを必要とする。

微生物のレセプターは標準生化学的技術により宿主細胞から精製できる。例えば、糖脂質はKarlssoonにより述べられた方法(Meth. Enzymol. 138:212-219, 1987)により精製できる。手短かに言えば、体液または細胞を1種以上の有機溶媒で抽出し、そして抽出物を穏やかにアルカリ分解する。中和および透析後、脂質および糖脂質を、例えば、ケイ酸およびイオン交換クロマトグラフィーのような一連のクロマトグラフィー技術により分離する。分取工程を薄層クロマトグラフィー(TLC)でチェックする。精製した、

完全なレセプターを本発明の複合体の製造に使用できる。これとは別に、化学的および/または酵素的試薬および技術を使用して、完全なレセプターを切断でき（その一部分を生じる）、および/または構造的に修飾できる（完全なレセプターまたはその一部の誘導体を生じる）。

代表的な例は、アシアロガングリオシドの精製である(Krivan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6157-6161, 1988)。手短かに言えば、フコシルアシアロ-GM<sub>1</sub>およびアシアロ-GM<sub>1</sub>を、ウシ脳ガングリオシドから25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中で80℃ 1.5時間の加水分解により調製した。加水分解物をNH<sub>4</sub>OHで中和し、そして重曹下で乾燥し、残留物をクロロホルム/メタノール/水(60:30:4.5、体積/体積)に溶解し、そしてセファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにかけ非-スフィンゴ糖脂質汚染物を除去した(Wells et al., Biochemistry 2:1259-1263, 1983)。フコシルアシアロ-GM<sub>1</sub>およびアシアロ-GM<sub>1</sub>を、DBAEセファロースのカラムクロマトグラフィーにかけて残留ガングリオシドから分離し、移動相としてクロロホルム/メタノール/水(75:18:2.5、体積/体積)を用いた分取シリカゲルGプレート上での連続薄層クロマトグラフィーによりさらに精製した(Young et al., Meth. Enzymol. 138:125-132, 1987)。0.2%タウロコール酸ナトリウムを含む0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)中で37℃で38時間ウシ睾丸β-ガラクトシダーゼ(0.5 単位/ml)を用いてアシアロ-GM<sub>1</sub>を消化後、アシアロ-GM<sub>1</sub>を得た。極性の汚染物を、それぞれセファデックスG-25およびDBAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにかけ除去した。

これとは別に、ひとたびレセプター構造が同定されたら、化学的および/または酵素的試薬および技術を使用して合成的に製造できる。同様に、レセプターの炭水化物部分を宿主細胞から単離でき、または構造決定後、合成的に製造できる。精製したレセプターまたはその一部に関する上記論議と同様に、構造的に修飾したレセプターまたはその一部を合成的に製造できる。

手短かに言うと、炭水化物の酵素的合成の場合は、天然の非保護モノ-、ジ-またはオリゴ-糖類およびシアル酸を出発原料として使用する。アノマー中心の適切に活性化したその誘導体を使わねばならないかも知れない。以後、グリコシド合成を特異的酵素を用いて実施する。化学合成の場合は、上記の同一の出発物質またはその誘導体を使用できる。この場合、残りの水酸基の適切な特異的保護と共にアノマー中心の適切な予備活性化を、特異的グリコシド合成で使用する前に実施すべきである。例えば、ヘキサースの5個の水酸基は-OR<sub>1</sub>ないし-OR<sub>2</sub>に変えることができ、R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>は保護基を表す。この化合物をグリコシル供与体として使用する場合は、R<sub>1</sub>は種々の触媒によるグリコシド合成での、活性化に適した基である。このような基の例はハロゲン化物、硫黄誘導体、アセトイミデートおよびオルトエステルである。反対に、この化合物をグリコシル受容体として使用する場合は、R<sub>1</sub>は以下に記載する保護基であり得る。R<sub>1</sub>は後の工程で上記の基に変換できるような方法で選ぶこともできる。3番目の可能性としては、R<sub>1</sub>は他の化合物とさらに結合するのに適切な配位子である。

グリコシル供与体として誘導体を使用する場合は、種々の分野からの保護基を使用できる。一般に使用する保護基は、例えば、

アセチル、ベンジル、ベンゾエートおよびアセタールである。この化合物をグリコシル受容体として使用する場合は、1個またはいくつかの水酸基を、グリコシド合成に使用し得るようにするために非保護とする。オリゴ糖合成を継続させるために水酸基を選択的に脱ブロックするような保護基を選択することが当分野で良く知られている。R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>は他の保護炭水化物残基または他の置換基または官能基であってもよい。グリコシル供与体とグリコシル受容体を、適切な触媒の存在下で共に反応させ、目的のグリコシド結合を生じさせることができる。保護基、アノマー基、触媒および反応条件の選び方により、立体選択性および希望の立体化学が得られる。所望により、この保護生成物を脱保護し、遊離のオリゴ糖にできる。更なる反応を実施する場合は、保護基およびアノマー中心を選択的に操作することにより、他のグリコシド化反応を促進する出発物質を適切に選択することにより、これを実施できる。これは段階的、またはブロックのアプローチの両方で実施できる。水酸基置換基も、他の官能基に変化させ、または結合に適切な配位子に結合させることができる。

(本頁以下余白)

好ましい作用剤は抗感染剤の仲間、例えば病原微生物による感染症の治療に有効な抗生物質や合成薬剤である。代表的な抗菌剤としてアミノグリコシド、ポリミキシン、スルホンアミド、メトロニダゾール、トリメトプリム-スルファメトキサゾールおよびペニシリンを挙げることができる。代表的な抗ウイルス剤はアシクロビルである。代表的な抗真菌剤にはアンフォテリシンB、ニスタチンおよび5-フルオロシチンが含まれる。代表的な抗寄生虫剤としてはペンタミジンとニトイミダゾールが挙げられる。有用な他の作用剤にはコルチコステロイドのようなステロイド類、例えばプレドニゾン、プレドニシロンおよびデキサメタゾンが含まれる。本発明のレセプター薬剤は、例えば宿主細胞の天然レセプターではなく人工レセプター（つまり、細胞毒性の作用剤に結合したものに結合するように病原体を“だます”ことにより、病原体を特異的に排除する効果的な薬剤ターゲティングシステム (drug targeting system) を提供するものである。また、病原体が宿主細胞にすでに付着していると、本発明のレセプター薬剤は、例えばレセプターに結合していない病原体の余分の特定分子を介して、病原体と結合するだろう。

本発明の複合体は、別の代表的な態様において、微生物の中和を誘導する分子を含むものである。例えば、このような作用剤は抗体産生を刺激する分子であり得る。例えば、病原微生物の炭水化物レセプターは一般に小さく、しかも自然界で宿主細胞に存在するので、それらは通常免疫原性がない。しかし、微生物レセプターは免疫原性を付与するキーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) のような担体分子に結合させるこ

微生物レセプターの他の代表的な例としては次の分子が含まれる。クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) および他の真菌類はスフィンゴ糖脂質のラクトシルセラミドに特異的に結合する (Jimenez-Lucho et al., *Infect. and Immun.* 58: 2085-2090)。単離したラクトシルセラミドと合成のラクトシルセラミドが市販されている (例えば、ミズーリ州セントルイス所在のシグマケミカル社、カリフォルニア州ラ・ジョラ所在のカルバイオケムペーリング社)。肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) はスルファチドおよび他の硫酸化糖脂質 (Krivan et al., *J. Biol. Chem.* 264:9283-9288, 1989) およびシアリル化糖タンパク質 (Roberts et al., *J. Biol. Chem.* 264:9289-9293, 1989) に特異的に結合する。硫酸化糖脂質は Krivan らにより記載されるように精製するか、商業的に入手できる (例えば Supelco 社)。同様に、シアリル化糖タンパク質は Roberts らに従って精製するか、商業的に入手できる (例えばシグマケミカル社)。インフルエンザウイルスはシアリ酸と特異的に結合する (Vels et al., *Nature* 333:428-431, 1988)。ロタウイルスは中性スフィンゴ糖脂質のアシアローGM<sub>1</sub> と特異的に結合する (Willoughby et al., *J. Virol.* 64:4830-4835, 1990)。

少なくとも1種の微生物レセプターに加えて、本発明の複合体は微生物を直接または間接的に抑制する少なくとも1種の作用剤を含む。多様多様の作用剤が適している。例えば、1つの実施態様では、微生物に対して細胞毒性の作用剤を微生物レセプターに結合させて、「レセプター薬剤」と呼ばれる複合体を形成する。

とができる。その結果、病原微生物がこのタイプのレセプター複合体と結合するとき、病原体は宿主による抗体産生を刺激する分子に、複合体のレセプター部分を介して結合することになる。複合体を介する病原体への抗体の結合は一連の現象を開始させ、その最終結果が病原体の中和となる。

作用剤は直接または間接的に、例えばリンカー基を介して、微生物レセプターに、例えば共有結合で、結合させることができる。作用剤とレセプターとの直接反応は、各々が他方と反応し得る置換基をもっているときに可能である。例えば、一方にアミノまたはスルフィドリル基のような求核性の基があると、他方のカルボニル含有基 (例えば酸無水物または酸ハロゲン化物) と、あるいは良好な離脱基 (例えばハライド) を含むアルキル基と反応させることができる。

また、作用剤とレセプターはリンカー基を介して結合させることが望ましいだろう。リンカー基は、例えば立体障害やコンホメーションの変化による結合能の妨害を回避するために、レセプターを作用剤から引き離すスペーサーとして機能しうる。リンカー基はまた、作用剤やレセプター上の置換基の化学反応性を増強するようにも作用し、従ってカップリング効率を向上させる。また、化学反応性の増加により、通常では使用できない作用剤もしくは作用剤の官能基の使用も可能になるだろう。例えば、カルボキシル基を活性化することができる。カルボキシル基の活性化はスクリンイミジルエステルのような“活性型エステル”の形成を含む。“活性型エステル”という用語は、求核置換反応において高度に反応性のエステルを指すことが知られている。

リンカー基としては、ホモ官能性とヘテロ官能性の両方の、種々の二官能性試薬あるいは多官能性試薬（例えば、ピアース・ケミカル社のカタログに記載されているもの）を使用できることが当業者には明らかだろう。カップリングは例えばアミノ基、カルボキシル基、スルフィド基または酸化型炭水化物残基を介して行うことができる。このような方法論を開示している文献は多数あり、例えば Rodwell 氏による米国特許第 4,671,858 号明細書を参照されたい。

作用剤が本発明の複合体のレセプター部分から遊離するとき、その効力が高まる場合は、開裂可能な、例えば生物開裂可能なリンカー基を用いることが望ましいだろう。多くの様々な開裂可能なリンカー基が以前に開示されている。これらのリンカー基からの作用剤の放出の作用機序として、ジスルフィド結合の還元（例えば、Splitter 氏による米国特許第 4,489,710 号）、光に不安定な結合の開裂（例えば、Senter 氏による米国特許第 4,625,014 号）、酵素活性化したアミノ酸残基の加水分解（例えば、Kohn 氏による米国特許第 4,638,045 号）、血清補体により媒介される加水分解（例えば、Rodwell 氏による米国特許第 4,671,858 号）、および酸により触媒される加水分解（例えば、Blattler 氏による米国特許第 4,569,789 号）による開裂が挙げられる。

微生物レセプターに 2 以上の作用剤を結合させることが望ましいだろう。ある態様では、多数の作用剤分子を 1 つのレセプター分子に結合させる。他の態様では、2 以上のタイプの作用剤を 1 つのレセプターに結合させてもよい。特定の態様を問わず、2 以上の作用剤を含む複合体はいろいろな方法で製造することができ

る。例えば、複数の作用剤結合部位を有するレセプターを直接結合させることも、複数の結合部位を与えるリンカーを使用することもできる。また、担体を使用することもできる。担体は、直接またはリンカー基を介する共有結合を含めて、いろいろな方法で作用剤を保持しうる。適当な担体としてアルブミン（例えば、Kato 氏による米国特許第 4,507,234 号）のようなタンパク質、ペプチド、およびアミノデキストラン（例えば、Shih 氏による米国特許第 4,899,784 号）のような多糖類がある。また、担体は非共有結合で、あるいは例えばリボソーム内へのカプセル化（例えば米国特許第 4,429,008 号および同第 4,873,088 号）により、作用剤を保持することもできる。同様に、複合体中には 2 以上の微生物レセプターを含めることが望ましいだろう。作用剤に関する上記論議がここにも適用される。例えば、1 以上の作用剤を封入している（すなわち、リボソーム小胞の内部に捕捉している）リボソーム担体に多数のレセプター分子が結合されている（例えば、リボソーム膜の中に組み込まれている）複合体を製造することができる。代表的な例はアモキシシリン、メトロニダゾールおよび/または次サリチル酸ビスマスのカプセル封入しているアシアロ GM<sub>1</sub> 含有リボソームである。

上述したように、本発明は上記複合体の使用法をも提供するものである。ある側面において、この方法はヒトのような温血動物に効果的な量の上記複合体を投与することから成っている。特定の複合体の選択ばかりでなく、その投与経路を決定する際にも、感染部位が最も重要な要因となることは当業者にとって自明であろう。例えば、皮膚の真菌感染症は局所投与で治療され、そして

耳の細菌感染症は経口投与で治療されるだろう。投与方法には経口、静脈内、筋肉内、局所および直腸投与が含まれる。経口投与の場合、複合体は丸剤、カプセルまたは液体の形態であり得る。どのような投与方法のときでも、複合体を生理学的に許容される担体または希釈剤、例えば水や生理食塩水、と組み合わせることができる。

温血動物に効果的な量の本発明複合体を投与することにより、病原微生物による感染症の治療が行われる。感染症の原因は細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌または寄生虫であり得る。代表的な細菌としてグラム陰性菌、グラム陽性菌、嫌気性菌、スピロヘータ、ミコプラズマおよび放線菌が挙げられる。代表的なウイルスには RNA および DNA ウイルス、例えばヘルペス、サイトメガロウイルス、インフルエンザ、肝炎ウイルス、RSV、HIV などが含まれる。代表的なマイコプラズマ科には肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*)、*M. hominis* (*M. hominis*)、ウレアプラズマ属およびアコプラズマ属が含まれる。代表的な真菌類としてはカンジダ属、クリプトコックス属、コクシジオリヂス属、スポロトリクス属、アスペルギルス属およびヒストプラズマ属がある。代表的な寄生虫には原生動物（例えばトリコモナス、ニューモシスチス、エントモエバ (*Entamoeba*)）および蠕虫（例えば線虫類、吸虫類）が含まれる。その他の病原微生物にはクラミジア/リケッチアの仲間、例えばトラコーマクラミジア (*C. trachomatis*)、オウム病クラミジア (*C. psittaci*)、*C. pneumoniae* (*C. pneumoniae*) (TWAR)、リケッチア属およびコクシエラ属の細菌が含まれる。

病原微生物が中和される作用機序は特定の複合体に含まれる作用剤のタイプにより決まる。例えば、抗体の産生を刺激するような、ある種の作用剤は存在する宿主細胞の防御機構と共同して働く。また、細胞毒性があるような他の作用剤は微生物をより直接的に不活性化するだろう。

個々の複合体の正確な用量は、用いる作用剤とレセプターにより変化する。特に、作用剤はそれらの効力に関して変化する、そしてレセプターは結合親和性に関して変化する。しかしながら、一般に、本発明複合体の効果的な量は体重 1 kg あたり約 0.1 ~ 10 mg であるだろう。個々の複合体の効果的な最適量の決め方は当業者にとって自明である。例えば、効果的な量は *in vitro* 実験とその後の *in vivo* 研究に基づいて決定されよう。かかる方法論は最小阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) の測定を含む。MIC の原理は、例えば、*in vitro* で特定の微生物の増殖を阻止するのに必要な抗菌剤の最低または最小濃度を測定することであり、通常この濃度はマイクログラム/ミリリットルで表される。承認された基準がナショナル・コミッティー・フォー・クリニカル・ラボラトリー・スタンダードにより発行されている (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 「好気的条件下で増殖する細菌の希釈抗菌感受性試験法」、暫定的なスタンダード NCCLS 出版物 M7-T2, Villanova, PA: NCCLS, 1988)。in vivo でのレセプター薬剤の効果的な最適量を決める場合は、その薬剤を受け取る患者から単離された微生物を阻止または殺菌する血清の希釈物が分析される。血清殺菌試験を行うための提案されたガイドラインはナショナル・コミッティー・フ

オー・クリニカル・ラボラトリー・スタンダードにより発行されている (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 「血清凝固試験の方法論」、提案されたガイドライン、NCCLS 文書 M21-P, Villanova, PA:NCCLS, 1988)。

授与される個々の複合体は個々の感染症または微生物の性質に依存する。感染症の性質を調べることは、体液を用いるアッセイのような、種々の公知方法により達成される。例えば、酵素免疫アッセイ、ラテックス凝集反応、凝集反応、カウンター免疫電気泳動、フルオロイムノアッセイおよびラジオイムノアッセイを含めた、微生物抗原を検出するための免疫学的方法が利用できる。これらの方法はすべて、特定の微生物の存在と病気の原因を推測する特定の微生物抗原、すなわち毒素、を検出する。単独または免疫学的方法と共に使用できる他の方法として、直接培養、顕微鏡検査、生化学および抗菌感受性試験がある。作用剤が抗生物質または合成薬剤である場合の懸念では、特定の感染症に効き目のある化合物を相応のレセプターに結合させる。例えば、アモキシシリンは肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の増殖を抑えるので、肺炎の治療にはアモキシシリンが用いられる。肺炎治療用のレセプター薬剤を製造するには、アモキシシリンをアシアロ-GM<sub>1</sub>オリゴ糖 (その炭水化物構造が微生物のレセプターである) に共有結合でカップリングさせることができる。本発明に含まれるレセプター薬剤の他の例としては、真菌類 (例えば、カンジダ属やクリプトコックス属) に対して用いられるラクツシラミド-アンホテリシンB複合体、およびマイコプラズマに対して用いられるスルファチオテトラサイク

## 特表平6-511466 (8)

リンまたはスルファチオテトラサイクリン複合体がある。代表的な微生物のために現在のところ選ばれた薬剤の例を以下の表1に示す。

表1

| 選ばれた薬剤           | 微生物              | 微生物のクラス |
|------------------|------------------|---------|
| アンホテリシン B        | カンジダ、トリコスポリス     | 真菌 (酵母) |
| ノニジアル            | トリコスポリス          | 原生動物    |
| アモキシシリン          | ペニシリン-感受性        | 細菌      |
| (正式には ペニシリン-感受性) |                  |         |
| アンホテリシン/アモキシシリン  | ストレプトコッカス ニューモニア | 細菌      |
| トリコスポリス/エリスロマイシン | マイコプラズマ ニューモニア   | マイコプラズマ |
| トリコスポリス          | トリコスポリス          | 細菌      |
| アモキシシリン/エリスロマイシン | ペニシリン-感受性        | 細菌      |

上述したように、本発明の複合体は、例えば生物学的調製物において、微生物の in vitro 阻止のために使用することができる。「生物学的調製物」という用語は、in vivo および in vitro で採取された (その後の操作を含むかまたは含まない) 生物学的試料と、合成的に製造されたものを含むものである。生物学的調製物の代表的な例として細胞、組織、液体および固体、例えば血液、尿、唾液、汗、精液、脳脊髄液および涙 (またはこれらに由来するもの) を挙げることができる。簡単に述べると、1以上の複合体を生物学的調製物に添加する。正確な最適濃度は用いる個々の複合体により変化するだろう。しかしながら、一般には、約 0.1 ~ 100 mg/ml の濃度が効果的であるだろう。本発明のこ

の面での用途の1つは、貯蔵中の生物学的調製物の微生物定着を防ぐことである。

限定のためではなく例示のために以下の実施例を提示する。

(本頁以下余白)

## 実施例

### 実施例1

#### アシアロ-GM<sub>2</sub>-アモキシシリンの調製

##### A. アシアロ-GM<sub>1</sub>-オリゴ糖の調製

融点は補正されている。反応は室温で行なった。濃縮は < 40 °C (浴) で行なった。旋光度は 25 °C でパーキン・エルマー 241 旋光計で記録した。降層クロマトグラフィーは、以下の溶出系を用いるシリカゲル 60 F<sub>100</sub>。(メルク社, Darmstadt, FRG) で行なった: A, 酢酸エチル: 酢酸: メタノール: 水 4: 3: 3: 2、B, クロロホルム: メタノール: 水 10: 5: 1、C, クロロホルム: メタノール: 水 11: 9: 2。スポットは 5% 硫酸水溶液を塗り乾かすことにより可視化した。シリカゲルクロマトグラフィーは、溶媒系 D の塩化メチレン: ピリジン 5: 1 および E のクロロホルム: メタノール: ジオキサン: 水: ピリジン 10: 5: 3: 1: 1 を用い、マトレックスシリカ S1、60 A、20 ~ 45 MY (アミコン社, Danvers, Ma. 01923, U.S.A.) を用いて行なった。塩化スルフル/トリフルック酸 (trifluoric acid) 試薬は、10% ジエチルエーテルを含むトルエン中 1 M とした。有機溶媒は購入試薬品質を有しており、適当な乾燥剤上で蒸留したものであった。

p-メチルフェニル 3,4,6-トリ-O-β-クロロベンジル-2-デオキシ-2-フルイミド-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (1):

ピリジン/トリエチルアミン 1: 1 (200 ml) 中の p-メチルフェニル-2-アジド-3,4,6-トリ-O-β-クロロベンジル-2-デオキシ-1-

チオ-β-D-ガラクトピラノシド (5.00 g) の攪拌溶液に室温にて H<sub>2</sub>S を飽和するまで通気した。該フラスコを封じて、攪拌を 2 時間続けた。次に、窒素を溶液中に激しく通して、塩化メチレン (100 ml) 中の無水フタル酸 (3.0 g) を添加した。この混合物を一晩攪拌した。次に、トルエン (100 ml) 中の無水酢酸 (50 ml) を添加した。2 時間後、水 (50 ml) を加えた。有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウムおよび 1 M の硫酸で洗浄し、蒸発させた。得られたシロップを 7/1 のトルエン/酢酸エチルにてクロマトグラフィーにかけた。適当な画分をジエチルエーテル/イソオクタンから結晶化して、純粋な (1) (3.88 g, 87.5 %), 融点 63 ~ 70 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 70.1° (c 1.0 クロロホルム) が得られた。

エチル 4-O-β-ガラクトピラノシル-1-チオ-β-D-グルコピラノシド (2) :

β-ラクトースペルアセテート (50 g)、エタントール (8.0 g、82.2 ml) および 200 ml の無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> の混合物に BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (8.5 g、7.3 ml) を室温にて加えた。2 時間後、TLC (トルエン/酢酸エチル 2/3) はそれ以上の反応を示さなかった。混合物を約 500 ml の 1 M の NaOH とともに振とうした。有機層を直接に蒸発させてメタノール (150 ml) 中に取り上げ、次にメタノール中の NaOMe (10 ml、0.5 M) を加え、その混合物を室温で一晩攪拌した。TLC (酢酸エチル/酢酸/メタノール/水 12/3/3/3) は 0.41 の R<sub>f</sub> を示す。反応混合物を Dowex (50w × 8, H<sup>+</sup>) で中性とし、濾過し、濃縮した。残留物はエタノール (300 ml) から再結晶した。収量 16.4 g、56 %, 融点 191 ~ 19

-チオ-β-D-グルコピラノシド (5) :

モレキュラーシーブ 3 Å (600 mg) を含む THF (10 ml) 中の化合物 (4) (100 mg) を室温で窒素下に NaCNBH<sub>3</sub> (100 mg) および HCl (ジエチルエーテル中で飽和) によって記載のように処理した。2 時間後、TLC (トルエン/酢酸エチル 4/1, R<sub>f</sub> 0.55) は完全な反応を示した。混合液を濾過し、ジクロロメタンと炭酸水素ナトリウムと水との間に分配した。純粋な (5) (82 mg、82 %) 融点 137 ~ 139 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 25.6° は酢酸エチル/イソオクタンからの結晶化後に得られた。

2-(p-ニトロフェニル) エチル 4-O-(6-O-ベンジル-2,3-ジ-O-p-クロロベンジル-β-D-ガラクトピラノシル)-2,3,6-トリ-O-p-クロロベンジル-β-D-グルコピラノシド (6) :

塩化メチレン (20 ml) 中の (5) (500 mg) の溶液を真素 (50 μ) およびモレキュラーシーブ 4 Å (5.0 g) を用いて 0 °C で攪拌しながら処理した。30 分後に、TLC (トルエン/酢酸エチル 4/1) は出発原料が残っていないことを示し、過剰の真素を 2 滴のシクロヘキセンで分解した。窒素雰囲気および 0 °C に保ちながら、塩化メチレン (10 ml) 中の 2-(4-ニトロフェニル)-エタノール (300 mg) および新しく活性化した塩化亜鉛 (5.0 g) の攪拌混合物中に該スラリーを滴下した。2 時間後、混合物を塩化メチレンで希釈し、濾過し、水および 1 M の硫酸で洗浄し、乾燥し、濃縮した。得られたシロップをイソオクタン/酢酸エチル 1/1 でクロマトグラフィーにかけた。R<sub>f</sub> 0.53 の純粋な物質を含む画分を集め、濃縮した (340 mg, 82 %)。NMR

2 °C。

エチル 4-O-(4,6-O-ベンジリデン-β-D-ガラクトピラノシル)-1-チオ-β-D-グルコピラノシド (3) :

(2) (3.00 g) とベンズアルデヒド (30 ml) の混合液を 1 時間室温で攪拌した。次に、蟻酸 (30 ml) を加え、攪拌をさらに 25 分間保った。その透明な溶液を攪拌しながらジエチルエーテル (400 ml) に注いだ。1 時間後、固体を濾出し、これを加熱しながらメタノール (50 ml) に溶解した。冷却後、ジエチルエーテル (25 ml) を加えた。一晩放置後結晶 (3.09 g, 84 %)、240 ~ 242 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 49.3° が得られた。

エチル 4-O-(4,6-O-ベンジリデン-2,3-ジ-O-p-クロロベンジル-β-D-ガラクトピラノシル)-2,3,6-トリ-O-p-クロロベンジル-1-チオ-β-D-グルコピラノシド (4) :

DMF (50 ml) 中の塩化 p-クロロベンジル (3.0 ml) および水素化ナトリウム (1.4 g) による 0 °C で、窒素下での (3) (2.00 g) の処理は、TLC (トルエン/酢酸エチル 4/1, R<sub>f</sub> 0.39) で単一のスポットを与えた。トルエンと 1 M 硫酸と水との間の分配およびジクロロメタン/酢酸エチル/イソオクタンからの結晶化は、3.57 g の (4)、77 %, 融点 179 ~ 183 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 10.9° (c 1.0, クロロホルム) を与えた。

エチル 4-O-(6-O-ベンジル-2,3-ジ-O-p-クロロベンジル-β-D-ガラクトピラノシル)-2,3,6-トリ-O-p-クロロベンジル-1

分析はこれが目的の (6) であることを示した。(6) の結晶、融点 110 ~ 112 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 22.8° は、ジエチルエーテル/イソオクタンから得られた。

2-(p-ニトロフェニル) エチル 4-O-(3,4,6-トリ-O-p-クロロベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-ガラクトピラノシル)-1-O-(6-O-ベンジル-2,3-ジ-O-p-クロロベンジル-β-D-ガラクトピラノシル)-2,3,6-トリ-O-p-クロロベンジル-β-D-グルコピラノシド (7) :

モレキュラーシーブ 4 Å (100 mg) を含む無水塩化メチレン (5.0 ml) 中の二糖 (6) (71 mg、1 eq) およびチオグリコシド (1) (58 mg、1.2 eq) の水溶液に、80% Cl<sub>2</sub>/HOTf 試薬 (0.30 ml、5 eq) を窒素下に攪拌しながら加えた。混合物を 2 時間攪拌し、その間に温度を 10 °C まで上げた。次に、ピリジン (100 μl) を添加し、混合液を室温でさらに 1 時間攪拌した。混合液を濾過し、酢酸エチルと炭酸水素ナトリウム水溶液間に分配し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮した。トルエン/酢酸エチルでのシリカゲルクロマトグラフィー後に 59 % の (7) が得られた。

2-(p-ニトロフェニル) エチル 4-O-(3,4,6-トリ-O-p-クロロベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-4-O-(6-O-ベンジル-2,3-ジ-O-p-クロロベンジル-β-D-ガラクトピラノシル)-2,3,6-トリ-O-p-クロロベンジル-β-D-グルコピラノシド (8) :

トルエン/95% エタノール、1/10 (10 ml) 中の三糖



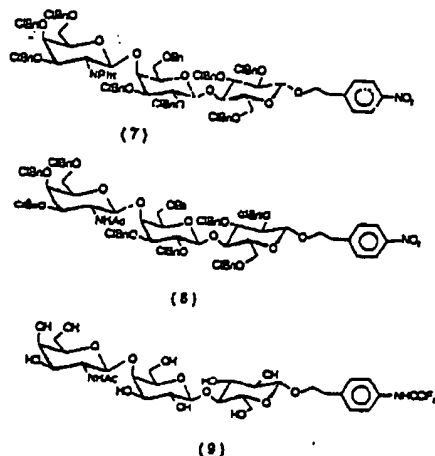
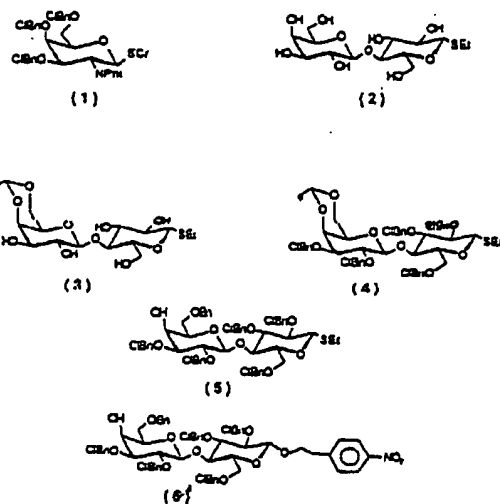
特表平6-511466 (8)

(7) (400 mg) の攪拌溶液中にヒドラジン水和物 (0.3 ml) および酢酸 (0.2 ml) を加えた。混合物を一晩還流し、冷却、濃縮し、トルエン/エタノールとともに共蒸発させた。残留物を無水酢酸/ピリジン 1/1 (5 ml) で30分間室温で処理した。濃縮し、トルエンと水との間に分配し、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濃縮してシロップを得た。このシロップをn-ヘプタン/酢酸エチル 1/1 でシリカゲルクロマトグラフィーにかけた (Rf 0.35)。適当な画分を集め、濃縮して、(8) を52 %の収率で得た。

2-(p-トリフルオロアセトアミドフェニル) エチル 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-4-O-β-D-ガラクトピラノシル-β-D-グルコピラノシド (8) :

THF (2 ml) と酢酸 (1 ml) と水 (0.1 ml) 中の化合物 (8) (50 mg) に亜鉛末 (100 mg) を加え、混合物を0℃で窒素下で攪拌した。次に、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (100 mg, ml, 0.2 ml) の溶液を加えた。30分後、TLC (n-ヘプタン: 酢酸エチル 1:1, Rf 0.28) は完全な反応を示した。混合物を濾過し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、炭酸水素ナトリウム水溶液、水で洗浄し、乾燥し (MgSO<sub>4</sub>)、濃縮した。残留物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) に溶解した。この溶液を20℃に冷却し、ピリジン (40 μl) および無水トリフルオロ酢酸 (20 μl) を添加した。10分後、TLC (n-ヘプタン: 酢酸エチル 1:1, Rf 0.13) は完全な反応を示した。混合物を濃縮乾燥し、酢酸ナトリウム (50 mg) を含む酢酸エチル: エタノール: 酢酸: 水 4: 2: 1: 1に溶解し、Pd/C (10 %, 50 mg) により大気圧で8時間記載の通りに水素化分解した。完全な

脱ベンジル化はTLC (酢酸エチル/メタノール/酢酸/水、12/3/3/2, Rf 0.15) により示された。既述のようなC-18クロマトグラフィーによる精製は80 %の(9)を与えた。化合物(1)~化合物(9)の構造は以下の通りである。



B. アシアロ-GM<sub>2</sub>オリゴ糖-アモキシシリンの調製

2-(p-アミノフェニル) エチル 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-4-O-β-D-ガラクトピラノシル-β-D-グルコピラノシド (10) :

100 mgの化合物(8)を50℃で10 mlの25 %アモニアに溶解する。混合物を1時間放置し、次にC18カラムに直接に入れ、pHが約9に達するまで水で洗浄する。次に、このカラムを30 %メタノールで溶出した。ニンヒドリン陽性画分を集め、その一部を蒸発させて大量のメタノールを除去した。残りの溶液を凍結乾燥し、TLCによれば純粋な、白色の綿毛のような粉末を得た。収率は95 %である。

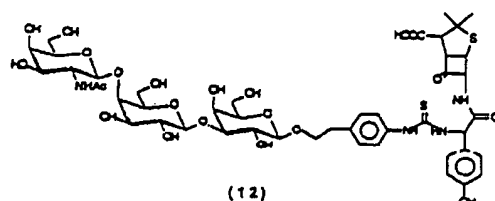
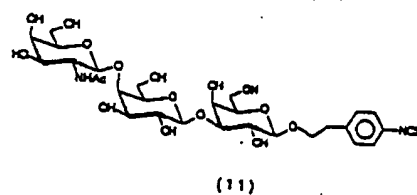
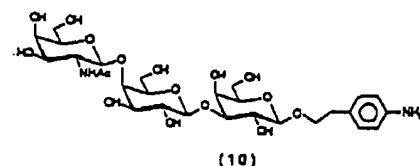
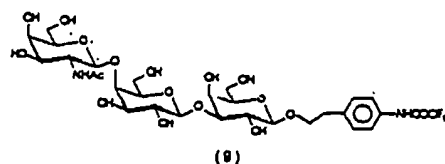
2-(p-イソチオシアナトフェニル) エチル 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-4-O-β-D-ガラクトピラノシル-β-D-グルコピラノシド (11) :

100 mgの化合物(10)を10 mlの70 %エタノールに室温で溶解する。この溶液に2倍過剰量のチオホスゲンを加え、溶液を5分間攪拌する。その後、十分なイオン交換体を加えて、pHを約5まで上げた(Dowex 1 × 2 OH型)。次に、このイオン交換体を濾別し、水で洗浄する。濾液を蒸発させて、大部分のエタノールを除去する。次に、残った溶液を凍結乾燥にて乾固し、TLCおよびNMRによれば基本的に純粋な、白い粉末を得た。収率は約50 %である。

2-(p-アモキシリンチオ尿素フェニル) エチル 4-O-(2-アセト

アミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-4-O-β-D-ガラクトピラノシル-β-D-グルコピラノシド (12) :

50 mg の化合物 (11) を 5 ml の DMF に溶解する。等モル量のアモキシシリンを加え、溶液を 2 日間室温に保って、透明な黄色溶液を得る。TLC (EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O : HOAc 12 : 3 : 3 : 2) では、ごくわずかな反応剤が見られ、少量の副生成物とともに一つの主要な生成物が見られる。真空ポンプを用い、わずかに室温よりも高い温度で溶媒を蒸発させた。残った固体は水に溶解して、C18 カラムによるクロマトグラフィーにかけた。最初に水で溶出し、その後 30 % メタノールで溶出する。目的の画分を集めて、メタノールを蒸発させた後に凍結乾燥する。当物質の構造は NMR および FAB/MS により確認する。収率は 6.2 % である。化合物 (9) ~ 化合物 (12) の構造を以下に示す。



#### 実施例 2

##### アシアロ-GM<sub>1</sub>-アモキシシリンの調製

##### A. アシアロ-GM<sub>1</sub>

アシアロ-GM<sub>1</sub> は上記に記載の通りガングリオシドから精製することができ、また購入することもできる (BioCarb Chemicals 社, Lund, Sweden)。

##### B. ヘテロ-二官能試薬を用いるアシアロ-GM<sub>1</sub>-アモキシシリンの調製

アシアロ-GM<sub>1</sub> (BioCarb Chemicals 社, カタログ # 85/03) お

よび他の関連する糖脂質を HPLC グレードのジメチルスルホキシド (DMSO) にて 10 mg/ml の濃度とし、使用するまで 4℃ で保存する。光ヘテロ二官能試薬 ANB-NOS (Pierce 社, カタログ # 21551) を暗所で HPLC グレードの DMSO に 300 mg/ml の濃度で溶解して、使用するまで、暗所 4℃ で保存する。アモキシシリン (シグマ社, カタログ # A-8523, ロット # 29F0730) を DMSO に 120 mg/ml の濃度で溶解する。暗所で、ANB-NOS-DMSO およびアモキシシリン-DMSO を 1 : 1 (重量/重量) の比率で混合し、室温で 1 時間インキュベートした (図 2 の工程 1)。暗所でのインキュベーション後、アシアロ-GM<sub>1</sub> を ANB-NOS-アモキシシリンとアシアロ-GM<sub>1</sub> の比率 1 : 2 : 1 で反応混合物中に加えた。反応混合物をサンランプ (G. E. 電球 # R SM-8) に 15 分間露光し、この際に反応混合物は黄色から琥珀色となり、アモキシシリン-アシアロ-GM<sub>1</sub> が生成する (図 2 の工程 2)。反応効率は約 30% ~ 50% である。

#### 実施例 3

##### 微生物レセプターを含みかつ抗菌剤をカプセル化するリポソームの調製

レセプターリポソームは、Gruner ら (Biochemistry 24:2833-2842, 1985) および Dahlgren ら (J. Immunol. Meth. 44:223-234, 1981) に記載の方法論に基づいて調製した。簡単に述べると、Dahlgren らにより記載されたようにコレステロール/ホスファチジルコリン/スフィンゴ脂質 (1 : 1 : 1, モル比) の比率を用いて、Gruner らの方法に従ってリポソームを調製した。糖脂質と糖脂質レセプターを用いたときはスフィンゴ脂質が対応する量の

糖脂質により還元された。薬剤 (類) をリポソーム形成の前に過剰に加えた。

脂質と糖脂質 (90 mg コレステロール, Matreya; 180 mg ホスファチジルコリン, Sigma; 90 mg スフィンゴミエリン, Sigma; 45 mg アシアロ-GM<sub>1</sub>, BioCarb Chemicals; 45 mg ホスファチジルエタノールアミン, Sigma) を丸底フラスコ中の 100 μl クロロホルムに溶解し、回転させながら蒸発させた。得られた薄膜を 50 ml のジエチルエーテルに溶解した。水性薬剤 (類) を HEPES 緩衝液に加えた (例えば、72.5 mM の NaCl, 72.5 mM KCl および 10 mM HEPES, pH 7.4 を含む緩衝液中の 25 mg/ml 濃度の次サリチル酸ビスマス, Crescent Chem. 社)。ジエチルエーテルの残りの 250 ml を加えた。室温以下に保った水浴中で超音波処理しながら、該エーテルを N<sub>2</sub> 気流で除去した。エーテルの除去は、約 99% のエーテルがなくなり、残った体積が、加えられた水相の体積とほぼ同じ又はそれ以下になったときに停止した。リポソームの形成はこの時点で完了しており、この段階は緩衝液中に白いワックス状の「ケーキ」の出現により確かめられる。

このリポソーム物質と緩衝液をガラス管に移し、室温で 20 分間 12,000 RPM (SA-800 ローター) で遠心した。リポソームペレットを HEPES 緩衝液 (一回の洗浄につき 50 ~ 100 ml) で 3 回洗浄した。最後の洗浄後にリポソームを HEPES 緩衝液 (例えば、各々の投与量が 1 回の投与につき 100 μl となるように) に再懸濁した。その代わりに、リポソームを高濃度のビスマス (25 mg/ml) 中に最終濃度 20 mg/ml で再懸濁してもよい。

## 実施例 4

アシアロ-GM<sub>1</sub>-アモキシシリンによるストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) のインビトロ抑制

最少阻止濃度 (MIC) の決定は National Committee for Clinical Laboratory Standards (暫定的なスタンダード NCCLS 出版物 M7-T2, Villanova, Pa., NCCLS, 1988) により公布された推奨に従って行なわれた。アモキシシリンとアモキシシリン-アシアロ-GM<sub>1</sub> (実施例 2 に従って調製されたもの) の制菌レベルと殺菌レベルを臨床的に単離されたストレプトコッカス・ニューモニエを用いて調べた。アモキシシリンおよびアモキシシリン-アシアロ-GM<sub>1</sub> の原液をグルコースを含まないトリプテカゼン-ソイブロス (Difco, の T-soy) に 10 μg/ml に希釈した。チューブ 1 が 5 μg/ml の抗生物質を含むように始めて、チューブ 1 が 0.0001 μg/ml を含むように、1 ml の培地を含む一連の 10 本のチューブの 2 倍希釈系列を原液から作った。これらのチューブのそれぞれに 0.5 McFarland スタンダードを用いて S. ニューモニエ (約  $1.5 \times 10^8$ ) 微生物/ml の懸濁液 0.05 ml を加えた。微生物を含まない T-ソイブロスと微生物を含む抗生物質を含まない T-ソイブロスとをそれぞれ陰性対照と陽性対照とした。すべてのチューブを 37°C で、5% CO<sub>2</sub>/95% 空気中で 18 時間インキュベートし、その濁度と MIC を読みとった。殺菌レベル (MBC) の決定のために、生育が肉眼では認められない各チューブから 0.001 ml を取り、5% ツツ血液寒天プレートに接種し、さらに 18 時間インキュベートした。対照チューブと比較してコロニー数の 99% 減少が殺菌性 (MBC) があるとみなした。アモキシシリンおよびアモキシシリン-アシアロ

-GM<sub>1</sub> の比較結果を表 2 に示す。

表 2

最少阻止濃度 (MIC) および最低殺菌濃度 (MBC) によって判定したストレプトコッカス・ニューモニエに対するアモキシシリンおよびアモキシシリン-アシアロ-GM<sub>1</sub> の比較

| 薬剤                             | MIC (μg/ml) | MBC (μg/ml) |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| アモキシシリン                        | 0.04        | 0.04        |
| アモキシシリン-アシアロ-GM <sub>1</sub> † | 0.005       | 0.005       |

† ANB-NOS- アモキシシリンと糖脂質の比率 1 : 1 を用いて調製した。

## 実施例 5

## カンビロバクター (ヘリコバクター) ・ピロリのインビトロ抑制

臨床的研究によれば、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 様微生物 (HPLD) は十二指腸潰瘍、胃炎および胃癌の原因を引き起こすかも知れないことが示唆されている。さらに、HPLD はヒトでの説明されていない嘔吐の原因となっている可能性がある。アカゲザルにおけるいくつかの研究は、ヒトに見られる HPLD によく似た微生物の存在を示した。この実験に用いられたサルにおいて、3 ~ 4 μm の長さで 0.5 ~ 10.0 μm の幅を有する小さい湾曲した棒状のバクテリアは、29 匹中 8 匹のサルの粘膜上皮細胞にすぐ近接する部分に見られた。これらのバクテリアはヒトに見られる C. ピロリに非常に似ていたために、HPLD と呼ばれた。

放射線誘導嘔吐と胃抑制に対するこれらバクテリアの影響は知られていない。

胃炎は、胃潰瘍、十二指腸潰瘍および胃癌に関連性があることが知られているものの、その治療は症状に依拠して依存しており、かりに何らかの向上が典型的な制酸剤および/またはヒスタミン H<sub>2</sub> アンタゴニストの投与後に観察されたとしても僅かであるということは興味を引くものである。対照的に、ピスマス塩の投与およびいくつかの抗生物質の投与は胃炎を改善させ、HPLD を絶滅させている。しかし、抗生物質の大量投与の長期使用は、正常なフローラを絶滅させ、バクテリアの耐性の発生へ導くかも知れず、感染の再発も非常によく起こる。

A. アシアロ-GM<sub>1</sub>-アモキシシリンによる処置

HPLD が胃バイオプシーにおいて存在しており、体重が 3 ~ 7 kg の 2 匹の国内生まれの雄のアカゲザル *Macaca Mulatta* を AALAC 公認の動物施設の通常の飼育室内で別個のステンレス鋼ケージに入れた。この 2 匹の感染サルを Tang (サルが食欲に飲み、医薬品の信頼性のある経口投与を可能とする飲み物) 中に希釈した偽薬または 7 ng/kg のアシアロ-GM<sub>1</sub>-アモキシシリン (実施例 2 に従って調製したもの) を盲検法で 1 日 3 回投与することにより処置した。この動物を 2 日間のみ処置したが、HPLD の培養物がみられたのは、レセプター複合体で処置した動物ではなく、偽薬を受けた動物の処置終了の直後に得られた胃の生体組織切片からであった。

## B. 微生物レセプターを含みかつ抗菌剤をカプセル化するリポソームによる処置

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*: HP) に対する特異的な糖脂質レセプターを含み、アモキシシリン、メトロニダゾールおよび次サリチル酸ピスマス (それぞれ 7、7、および 10 ng/kg) をカプセル化するリポソームを実施例 3 に従って調製した。インビトロで、これらのリポソームは遊離の抗菌剤のみに比較してプロスでの HP の生育を 4 ~ 10 倍抑制した。自然に HP 様微生物 (HPLD) に感染した、群で繁殖させた 8 匹のアカゲザルに関して、麻酔下で胃と十二指腸の鏡検査および粘膜の生体組織切片検査を行った。次に該動物にリポソーム複合体を 5 日間経口投与して、4、17 および 80 日後に内視鏡検査を繰り返した。粘膜の生体組織切片を HP 培地で生育させ、そのウレアーゼ活性を調べ、光学顕微鏡検査のために固定化し、感染が存在するか否かを盲検法で評価した。それぞれの時間において、(40 の非感染子供の平均値 + 3 標準偏差のパーセントとしての) 血漿 IgG レベルを H. ピロリ抗原のプールに対して、ヒト感染に対する > 95% の感度と特異性を有するアッセイにより決定した。処置の終了後の 1 週間以内に、洞においてではなく、体において感染が減少するか抑制され、血漿 IgG は有意に変化しなかった (0.85 ± 0.14 対 0.89 ± 0.09; NS)。

上記記載から、本発明の具体的な実施態様を例示のためにここに記載したが、多様な変改が本発明の精神と範囲を逸脱することなく行なえることが明らかだろう。

FIG.1

## レセプター薬剤合成の工程図

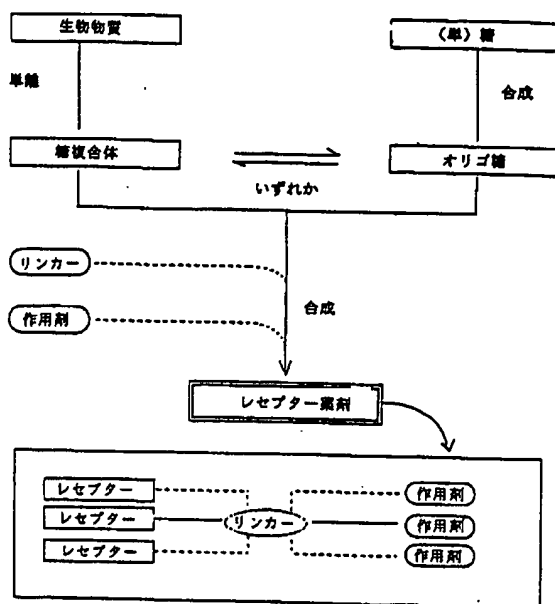
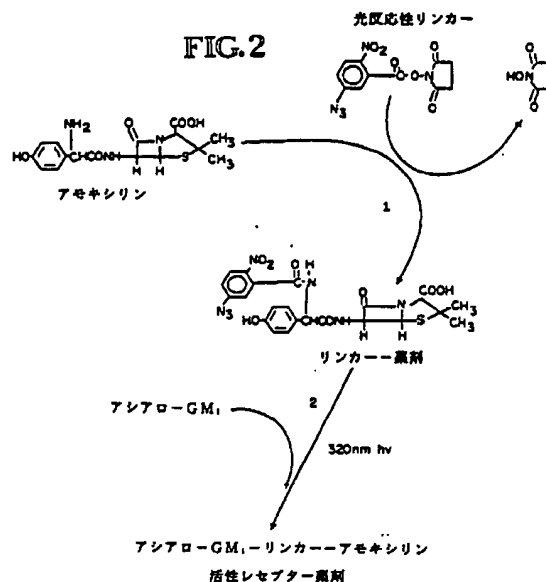


FIG.2



## 国際調査報告

International Application No. PCT/US 91/05422

|   |  |
|---|--|
| 1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC<br>Int.Cl. 5 A61K47/48; A61K9/127 |  |
| 2. FIELD OF INVENTION   |  |
| Chemical Name: A61K   |  |
| Chemical Name: A61K   |  |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |  |
| Category  | Relevance to Claims No.  |
| X   | MO.A.8 901 519 (CHILDREN'S HOSPITAL CORPORATION) 23 February 1989<br>see page 12, line 23 - page 13, line 30   |
| X   | MO.A.8 803 810 (CENTRAL BLOOD LABORATORIES AUTHORITY) 2 June 1988<br>see page 1, line 3 - page 6, line 3<br>see page 6, line 16 - page 9, line 17<br>see page 12, line 30 - page 13, line 17 |
| X   | EP.A.0 409 527 (ENGELHARD CORPORATION) 23 January 1991<br>see page 2, line 22 - line 34<br>see page 9, line 1 - line 8; claims 1-20  |
| X   | DE.A.3 711 784 (HARDO BOERNER MEDIZINISCHE KLINIKUM GMBH) 20 October 1988<br>see the whole document  |
| 4. SUMMARY OF THE INVENTION   |  |
| 5. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS  |  |
| 6. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION  |  |
| 7. CLAIMS   |  |
| 8. REFERENCES   |  |
| 9. OTHER INFORMATION  |  |
| 10. SIGNATURE   |  |
| 11. ADDRESS   |  |
| 12. OTHER INFORMATION   |  |

|   |  |
|---|--|
| 13. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |
| Category                                | Relevance to Claims No.  |
| X                                       | MO.A.8 605 789 (BIOCARD AB) 9 October 1986<br>see the whole document   |
| A                                       | MO.A.9 105 771 (SCHREIER) 2 May 1991<br>see the whole document   |
| A                                       | EP.A.0 034 277 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 September 1981<br>see the whole document   |
| A                                       | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA<br>vol. 85, 1988, WASHINGTON D.C., USA<br>pages 6157 - 6161;<br>KRIVAN ET AL: 'MANY PULMONARY PATHOGENIC BACTERIA BIND SPECIFICALLY TO THE CARBOHYDRATE SEQUENCE GALNA6-6GAL FOUND IN SOME GLYCOLIPIDS'<br>cited in the application<br>see the whole document |
| A                                       | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104,<br>1986, Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 86285G;<br>TROUET ET AL: 'DRUG TARGETING: A LONG WAY FROM CONCEPT TO CLINICAL APPLICATIONS'<br>page 355; column 1;<br>see abstract  |
| A                                       | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101,<br>1984, Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 84922T;<br>TROUET ET AL: 'CELL TARGETING OF PRIMAQUINE'<br>page 118; column 2;<br>see abstract  |
| A                                       | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99,<br>1983, Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 84782C;<br>NICOLAU ET AL: 'LIPOSOMES AS CARRIERS FOR GENE TRANSFER IN VIVO'<br>page 114; column 2;<br>see abstract   |

| IS DOCUMENT CONSIDERED TO BE RELEVANT? |   | IDENTIFIED FROM THE SECONDARY SEARCH? |
|--|---|---------------------------------------|
| Category *                             | Criteria of Relevance, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Indication to Class No.               |
| A                                      | <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 183015A;<br/>DASGUPTA ET AL.: 'RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF ASTALOGANGLIOSIDE LIPOSOMES: SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF THE LIPOSOMAL MARKER IN ISOLATED LIVER CELL TYPES' page 401; column 2; see abstract</p> |                                       |

See PCT/US 91/05422, page 11/12

This table lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are not included in the European Patent Office EPO file as The European Patent Office is in no way liable for data perturbations which are already given for the purposes of information. 02/04/92

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)  | Publication date   |
|--|------------------|--|--|
| WO-A-8901519                           | 23-02-89         | AU-A- 2426228<br>EP-A- 0375736<br>JP-T- 2504381                                    | 09-03-89<br>04-07-90<br>27-12-90                         |
| WO-A-8803510                           | 02-06-88         | AU-B- 610104<br>AU-A- 8277387<br>DE-A- 3774279<br>EP-A, B 0333740<br>JP-T- 2801105 | 15-05-91<br>15-06-88<br>08-12-91<br>27-09-89<br>10-05-90 |
| EP-A-0409527                           | 23-01-91         | CA-A- 2017739<br>JP-A- 3082898   | 19-01-91<br>07-03-91                                     |
| DE-A-3711744                           | 20-10-88         | None   |  |
| WO-A-8605789                           | 09-10-86         | AU-A- 5668286<br>EP-A- 0217912   | 23-10-86<br>15-04-87                                     |
| WO-A-9105771                           | 02-05-91         | AU-A- 6521790  | 15-05-91   |
| EP-A-0036277                           | 23-09-91         | CA-A- 1169239<br>US-A- 4598091   | 10-04-94<br>01-07-96                                     |

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/91